

# ACCUMULATION OF AMINO ACIDS AND PEPTIDES INTO LIPOSOMES

Publication number: JP6501246T

Publication date: 1994-02-10

Inventor:

Applicant:

Classification:






- international: A61K9/127; A61K31/223; A61K38/00; A61K38/10;  
A61K38/22; A61K38/25; A61K9/127; A61K31/21;  
A61K38/00; A61K38/10; A61K38/22; A61K38/25;  
(IPC1-7): A61K37/02; A61K9/127

- European: A61K9/127P2; A61K38/10D; A61K38/22; A61K38/25

Application number: JP19910514831T 19910725

Priority number(s): US19900559946 19900731

Also published as:

	WO9202244 (A1)
	EP0555229 (A1)
	US5380531 (A1)
	EP0555229 (A4)
	EP0555229 (A0)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP6501246T

Abstract of corresponding document: **WO9202244**

The present invention relates to liposomal compositions having a concentration gradient which load amino acids and peptides exhibiting weak acid or base characteristics into liposomes. Specifically loaded into liposomes by the methods of the present invention are C-terminal substituted amino acids or peptides. The liposomes are preferably large unilamellar vesicles. The concentration gradient is formed by encapsulating a first medium in the liposomes, said medium having a first concentration of the one or more charged species, and suspending the liposomes in a second medium having a second concentration of the one or more charged species, such as for example a pH gradient. Also disclosed are pharmaceutical preparations comprising such C-terminal substituted amino acids or peptides which have been loaded into the liposomes by the method of the invention.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-501246

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)2月10日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

A 6 1 K 37/02

9/127

識別記号

庁内整理番号

F 1

8314-4C

L 7329-4C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平3-514831  
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)7月25日  
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)1月28日  
(86) 国際出願番号 PCT/US91/05281  
(87) 国際公開番号 WO92/02244  
(87) 国際公開日 平成4年(1992)2月20日  
(31) 優先権主張番号 559, 946  
(32) 優先日 1990年7月31日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE), AU, CA, JP, KR

(71) 出願人 ザ リボソーム カンパニー, インコーポ  
レイテッド  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
08540 プリンストン プリンストンフォ  
レストアルセンター リサーチウェイ 1  
(72) 発明者 チャクラバルティ, アジョイ  
カナダ国 プリティッシュコロンビア州  
ヴィ6アール 2アール4 ヴァンクーバ  
ー ウエストウエルフスアベニュー  
4503  
(74) 代理人 弁理士 大多和 明敏 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノ酸及びペプチドのリボソーム内への蓄積

(57) 【要約】

本発明は、弱酸又は弱塩基特性を示すあるアミノ酸及びペプチドをリボソーム内に装填する、濃度勾配を有するリボソーム組成物に関するものである。具体的には、C末端置換アミノ酸又はペプチドが、本発明の方法により、リボソーム内に装填される。リボソームは、大単ラメラ小胞であることが好ましい。例えば、pH勾配のような濃度勾配は、(a)一つもしくはそれ以上の荷電種の第一の濃度を有する第一の媒体をリボソーム内にカプセル化し、(b)一つもしくはそれ以上の荷電種の第二の濃度を有する第二の媒体中にリボソームを懸濁させることにより形成される。本発明の方法によりリボソーム内に装填されたかかるC末端置換アミノ酸又はペプチドを含む医薬製剤も開示されている。

## 請求の範囲

1. (a) 膜を挟んで、一つもしくはそれ以上の荷電種 (charge d species) の濃度勾配を有し、該濃度勾配が、ペプチドをリボソーム内に装填させるようにする膜内外ポテンシャルを発生させることができるリボソームを調製する工程、及び (b) アミノ酸又はペプチドをこのリボソームと混合する工程、からなるC末端置換アミノ酸又はペプチドをリボソームに装填する方法。
2. 濃度勾配が、
  - (a) 一つもしくはそれ以上の荷電種の第一の濃度を有する第一の媒体をリボソーム内にカプセル化し、そして
  - (b) 一つもしくはそれ以上の荷電種の第二の濃度を有する第二の媒体中に該リボソームを懸濁させることにより形成される請求の範囲1の方法。
3. 濃度勾配がpH勾配である請求の範囲2の方法。
4. アミノ酸又はペプチドが、リジンメチルエステル、リジンアミド、リジニエチルエステル、ボンベシン、ガストリン関連ペプチド又は成長ホルモン放出因子断片である請求の範囲1の方法。
5. 請求の範囲1の方法によりリボソーム内に装填されたC末端置換アミノ酸又はペプチドを含む医薬製剤。
6. アミノ酸又はペプチドが、リジンメチルエステル、リジンアミド、リジニエチルエステル、ボンベシン、ガストリン関連ペプチド又は成長ホルモン放出因子断片である請求の範囲5の医薬製剤。
7. C末端置換アミノ酸又はペプチドをその中にカプセル化した

## 明細書

## アミノ酸及びペプチドのリボソーム内への蓄積

いくつかの生体アミン及び抗癌剤は、“遠隔装填 (remote loading)” として知られているプロトン勾配を加えることによって、リボソーム内に蓄積することがわかっている [例えば、Mayer 等、バイオヒミカ・バイオフィジカ・エト・アクタ (Biochim. Biophys. Acta), **857**, 123 (1986)、Mayer 等、バイオケミストリー (Biochemistry), **27**, 2053 (1988) 及び M. B. Bally 等、ケミカル・アンド・フィジカル・リビズ (Chem. Phys. Lipids), **47**, 97 (1988) 参照]。この装填技術では、任意のリボソームパラメーターを単独で変えることができる。通常の技術に比較してはるかに高い、脂質に対する薬剤の割合を達成することができる [Mayer 等、Chem. Phys. Lipids, **40**, 333 (1986)]。更に、薬剤の膜内外分布は、一般に、小胞内媒体の緩衝能の変化により薬剤濃度を調整するプロトン勾配によって決まる。

非両性イオン弱塩基である薬剤を取り込むために、プロトン及び他のイオン勾配を用いることが、アドリアマイシン、局所麻酔剤であるジブカイン及びドパミン並びに他の薬剤に関して実用的であることがわかっている。この系の利点としては、十分な薬剤取り込み、受動的に取り込まれた薬剤よりも低速での薬剤放出、及び他で達成できるよりも脂質に対する薬剤の割合が高いことが挙げられる。

更に、薬剤の存在しないときに、リボソームを調製できるので、保存中の薬剤放出又はリボソーム調製中の薬剤分解にともなう問題を避けることができる。pH勾配でのリボソーム内薬剤蓄積は、

リボソームを含み、該リボソームが、それらの膜を挟んで膜内外ポテンシャルを有し、この膜内外ポテンシャルは、剤が正に帯電していれば、リボソームの内部ポテンシャルが外部媒体のポテンシャルに対して負であり、剤が負に帯電していれば、リボソームの内部ポテンシャルが外部媒体のポテンシャルに対して正であるようになっている医薬製剤。

8. 膜内外ポテンシャルが、リボソーム膜を挟んで一つ以上の荷電種の濃度勾配を生成することにより作られている請求の範囲7の医薬製剤。

9. 濃度勾配がpH勾配である請求の範囲8の医薬製剤。

10. アミノ酸又はペプチドが、リジンメチルエステル、リジンアミド、リジニエチルエステル、ボンベシン、ガストリン関連ペプチド又は成長ホルモン放出因子断片である請求の範囲7の医薬製剤。

他の弱塩基、例えば、pH勾配プローブであるメチルアミンと同様な方法で生ずると信じられている。メチルアミンは、非帯電形態でのリボソーム膜の両側を平衡化し、その環境のpHのヘンダーソン-ハッセルバッハ (Henderson-Hasselbach) の関係に従って、再イオン化する。平衡分布は、膜内外pH勾配を反映し、その再分布をこれらの勾配の測定に用いることができる。

しかし、ヘンダーソン-ハッセルバッハの関係によってイオン化される能力を有する全ての医薬が、この関係にしたがってリボソーム内に蓄積するのではない。事実、ある医薬は、蓄積するようには全くみえない。更に、この関係にしたがって蓄積するかも知れないと考えられるある医薬は、直ちに放出され、製造直後に使用しなければならず、除放射性製品として実質的に使用できない非実質的な医薬製剤となる。

リボソームは、取り込まれた水性容積を含む完全に閉鎖された脂質二分子膜である。リボソームは、単ラメラ (1 個の膜) でも、多重ラメラ (複数の膜状二分子膜が、水性層により、それぞれ隣接する膜から分離されていることを特徴とする玉葱状構造物) でもよい小胞である。二分子膜は、疎水性“尾”領域と親水性“頭”領域とを有する2つの脂質単分子膜で構成されている。膜状二分子膜においては、脂質単分子膜の疎水性 (非極性) “尾”が二分子膜の中心に向かって配向し、一方、親水性 (極性) “頭”は水性相に向かって配向している。

本発明の一つの態様は、弱塩基又は弱塩基特性を示すあるアミノ酸及びペプチドの装填を開示することである。より具体的には、本発明のこの態様のアミノ酸及びペプチドは、C末端及びその他のカルボキシル基の機能が、その置換により変性されており、例

例えば、エステル又はアミドのような官能基と結合しているものである。更に具体的には、本発明の塩基性アミノ酸及びペプチドは、メチルエステル、エチルエステル又はアミドの形に変性されている。

膜内外濃度勾配、より具体的には膜内外pH勾配による装填は、C末端カルボキシル官能基が置換され、アミノ酸又はペプチドが弱酸又は弱塩基特性を示すような、更に具体的には、かかるアミノ酸又はペプチドのカルボキシル官能基が、アミドやメチルエステルのような非酸性基に変性されている、あるアミノ酸及びペプチドに対して生じる。このようなアミノ酸誘導体及びペプチド誘導体は、弱塩基特性を示す。このようなアミノ酸及びペプチドは、膜内外濃度勾配（例えば、膜内外pH勾配）（内側は酸性）による本発明の方法でLUV内に装填される。

本発明の方法は、アミノ酸誘導体であるリジンメチルエステル、リジンアミド及びリジンエチルエステル並びにペプチドであるボンベンシ（pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>）、ガストリン関連ペプチド（N-t-BOC-Trp-Met-Asp-Phe-アミド）及び成長ホルモン放出因子断片（Lys-Tyr-Trp-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>）について、膜内外濃度勾配による装填をもたらす。

しかし、本発明の方法は、他のアミノ酸及びペプチドをLUV内に装填することにはならない。例えば、ペプチドであるヒスチジンメチルエステル、（Lys）、メチルエステル及び（Lys-Ala）、メチルエステルは、本発明の方法によってリボソーム内に装填することができない。

カルボキシル官能基が、アミドやメチルエステルのような非酸性基に変性されている、アミノ酸又はペプチドを、リボソームに装填する方法に関するものである。このようなアミノ酸誘導体及びペプチド誘導体は、弱塩基特性を示す。

装填は、膜を挟んで、一つもしくはそれ以上の荷電種（charge species）の濃度勾配を有し、該濃度勾配が、ペプチドをリボソーム内に装填させるようにする膜内外ポテンシャルを発生させることができるリボソームを調製すること、及びアミノ酸又はペプチドをこのリボソームと混合することを含む。リボソームは、任意の方法で形成することができるものであるが、大単ラメラ小胞（large unilamellar vesicles）であることが好ましい。濃度勾配は、一つもしくはそれ以上の荷電種の第一の濃度を有する第一の媒体をリボソーム内にカプセル化し、そのリボソームを、一つもしくはそれ以上の荷電種の第二の濃度を有する第二の媒体中に懸濁させることにより形成される。このような濃度勾配は、例えば、pH勾配であることができる。

本発明の膜内外濃度勾配法により装填することのできるアミノ酸誘導体及びペプチド誘導体としては、アミノ酸誘導体であるリジンメチルエステル、リジンアミド及びリジンエチルエステル並びにペプチドであるボンベンシ（pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>）、ガストリン関連ペプチド（N-t-BOC-Trp-Met-Asp-Phe-アミド）、成長ホルモン放出ペプチドTyr-Gly-Trp-Phe-Phe-アミド及びTrp-Ala-Trp-Phe-Ala-アミド、及び成長ホルモン放出因子断片（Lys-Tyr-Trp-

図1は、7.5/4.0（外部/内部）のpH勾配を有する100nmのEPC小胞内へのリジンメチルエステルの時間経過をグラフで示す（白丸）。pH勾配のない対照小胞（7.5/7.5-白三角及び4.0/4.0-白四角）についてもテストした。取り込みは、20℃で行なった。リジンメチルエステルの外部濃度は、1.3mMであった。

図2は、7.5/4.0（外部/内部）のpH勾配を有する100nmのEPC:コレステロール小胞（55:45モル%）内へのリジンメチルエステルの取り込みの時間経過をグラフで示す。取り込みは、4℃（白丸）、20℃（白三角）及び37℃（白四角）で行なった。リジンメチルエステルの外部濃度は、2.0mMであった。

図3は、7.5/4.0（外部/内部）（白四角）及び7.5/7.5（外部/内部）（白丸）のpH勾配を有する100nmのEPC小胞内へのLys-Tyr-Trp-Trp-Phe-アミドの取り込みの時間経過をグラフで示す。取り込みは、23℃で行なった。Lys-Tyr-Trp-Trp-Phe-アミドの外部濃度は、76μMであった。

本発明は、pH勾配を有するリボソーム組成物に関し、かかるリボソームは、イオン（プロトン）濃度の異なる第一の内部緩衝水溶液と第二の外部緩衝水溶液とを用いてリボソームを製剤化することにより、ヘンダーソン-ハッセルバルツの関係から予想されるような、著しく高いアミノ酸及びペプチドの蓄積を示す。

更に、本発明は、C末端カルボキシル官能基置換アミノ酸又はペプチド、従ってアミノ酸又はペプチドが弱酸又は弱塩基特性を示すような、更に具体的には、かかるアミノ酸又はペプチドのカル

p-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>）が挙げられる。

ペプチドであるヒスチジンメチルエステル、Trp-Nle-Arg-Phe-アミド（軟体心臓興奮神経ペプチド類似物）、p-Glu-Ser-Leu-Arg-Trp-アミド（いそぎんちゃく神経ペプチド）、黄体形成ホルモン放出ホルモン（pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>）、Lys-バソプレシン（Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>）、（Lys）、メチルエステル及び（Lys-Ala）、メチルエステルは、本発明の方法によってリボソーム内に装填することができない。

本発明の方法によりリボソーム内に装填されたこのようなC末端置換アミノ酸又はペプチドを含む医薬製剤も開示される。

装填方法は、アミノ酸誘導体又はペプチド誘導体を、膜を挟んで膜内外ポテンシャルを有するリボソームと混合することにより進行し、この膜内外ポテンシャルは、剤が正に荷電していれば、リボソームの内部ポテンシャルが外部媒体のポテンシャルに対して負であり、剤が負に荷電していれば、リボソームの内部ポテンシャルが外部媒体のポテンシャルに対して正であるようになっていく。膜内外ポテンシャルは、膜を挟んで一つ以上の荷電種の濃度勾配、例えば、H<sup>+</sup>イオンを生成することにより、作ることができ、この場合、濃度勾配はpH勾配である。

一般に、本発明のリボソーム組成物は、とりわけ、卵ホスファチジルコリン（EPC）、水酸化大豆ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジミリスチルホスファチジルコリン、ジアラチドノイルホスファチジルコリンなどのリン

脂質を含んでもよく、更に、多くのステロイド組成物及び他の組成物を含んでもよい。

リボソーム組成物が更にステロイド組成物を含む場合は、コレステロールを含んでもよく、55:45 (脂質:ステロイド脂質)の重量比で、好ましく用いることができる。

本発明は、膜内外イオン勾配、好ましくは膜内外pH勾配を示すリボソーム内に、アミノ酸及びペプチドを有効に取り込むことを開示する。

この発明の膜内外濃度勾配法により装填することができるアミノ酸誘導体及びペプチド誘導体としては、アミノ酸誘導体であるリジンメチルエステル、リジンアミド及びリジンエチルエステル並びにペプチドであるポンペシン (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>)、ガストリン関連ペプチド (N-t-BOC-Trp-Met-Asp-Phe-アミド) 及び成長ホルモン放出因子断片 (Lys-Tyr-Trp-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) が挙げられる。

ペプチドであるヒスチジンメチルエステル、(Lys)、メチルエステル及び(Lys-(Ala))メチルエステルは、本発明の方法によってリボソーム内に装填することができない。

本発明のリボソームは、当該技術において公知の任意の方法で形成することができるが、好ましくは、Balley等、PCT出願番号US86/01102、1986年2月27日公開、及びMayer等、PCT出願番号US88/00646、1988年9月7日公開、に記載されている方法により形成するのが好ましい。これらの技術により、イオン化しうる剤をリボソームに装填する

におけるよりもはるかに容易にリボソームの脂質層を通り抜けるであろう。このようにして、外部緩衝液内の荷電していない剤は、容易にリボソームを通り抜けて内部緩衝液に入り、プロトン化され、リボソーム層を容易に通じ抜けない“取り込まれた”プロトン化された分子として、リボソーム内に残るであろう。剤は、このように、内部緩衝液と外部緩衝液との間のpH勾配の関数として、リボソーム内に集まるであろう。

以下に詳細に述べるような代表的なリボソーム調製技術では、それらが形成される際に、第一の緩衝水溶液がリボソームを取り囲み、リボソームの内側と外側の緩衝液となる。濃度勾配を生じさせるためには、荷電種の濃度が内部緩衝液とは異なるように、元の外部緩衝液を酸性又は塩基性にするか、あるいは外部緩衝液を、異なる荷電種を有する新しい外部媒体と置換してもよい。外部媒体の置換は、種々の技術、例えば新しい媒体で平衡化したゲル濾過カラム、例えばセファデックス (Sephadex) カラムにリボソーム製剤を通すか、又は透析若しくは関連技術により行うことができる。

本発明においては、酸性 (pH約3.0~5.0) の第一の内部緩衝液及びpHが好ましくは約6.5と8.0の間、好ましくは7.4である第二の外部緩衝液を用いて形成されるリボソーム組成物が好ましい。外部緩衝液のより塩基性又は中性pHと相対的に、内部緩衝液のpHを低くすることにより、リボソーム内に剤を蓄積させるように作用する膜内外勾配が生成する。

本発明のリボソーム製剤に用いることのできる脂質には、合成又は天然のリン脂質があり、とりわけ、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファ

チジルセリン (PS)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルイノシトール (PI)、スフィンゴミエリン (SPM)、カルジオリビンの単独又は組合せが挙げられる。本発明において有用なリン脂質としては、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) 及びジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) も挙げることができる。他の実施態様では、ジステアリアルホスファチジルコリン (DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 又は水素化大豆ホスファチジルコリン (HSPC) を用いてもよい。ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) とジアラチドノイルホスファチジルコリン (DAPC) とを同様に用いてもよい。

この技術では、膜内外イオン (pH) 勾配がリボソームの内部膜及び外部膜の間に生じ、そのイオン (pH) 勾配により、リボソーム内に剤が装填され、それが取り込みを行わせる。例えば、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、K<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>、OH<sup>-</sup>、好ましくはH<sup>+</sup>のような一つ以上の荷電種について、リボソーム膜を挟んで濃度勾配を作ることによって、膜内外勾配が生じるので、そのイオン勾配により、膜を越えてのイオン化しうる剤の取り込みが行われる。

本発明では、膜内外イオン (H<sup>+</sup>) 勾配を用いて、イオン勾配を作り、弱塩基性薬基を有する傾向のある剤をリボソーム内に装填するのが好ましい。本発明においては、まず、リボソームを緩衝水溶液中で形成するのが好ましい。最初の溶液は、装填しようとする剤が、塩基性pHで荷電種を生ずるか、あるいは酸性pHで生ずるかによって、酸性か塩基性のいずれかである。例えば、弱塩基性剤を装填する場合、荷電種は、低いpH、即ち約2.0~5.0のpH、好ましくは約4.0のpHで生成する。酸性内部緩衝水溶液を有するリボソームの形成後、リボソームに対して外部の緩衝液を、内部緩衝液のpHよりもかなり高いpH、好ましくは内部緩衝液よりも少なくとも約3.0~4.0pH単位高いpHに変える。

外部緩衝液を変更することにより、リボソーム内への剤の蓄積を行うpH勾配が生ずる。一般に、剤は、荷電していない形態において、荷電した (弱塩基性の剤の場合、プロトン化した) 形態

チジルセリン (PS)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルイノシトール (PI)、スフィンゴミエリン (SPM)、カルジオリビンの単独又は組合せが挙げられる。本発明において有用なリン脂質としては、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) 及びジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG) も挙げることができる。他の実施態様では、ジステアリアルホスファチジルコリン (DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 又は水素化大豆ホスファチジルコリン (HSPC) を用いてもよい。ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) とジアラチドノイルホスファチジルコリン (DAPC) とを同様に用いてもよい。

DSPC (65℃のT<sub>c</sub>)、DPPC (45℃のT<sub>c</sub>)、DAPC (85℃のT<sub>c</sub>) のように、脂質の転移温度 (T<sub>c</sub>) が高いため、これらのリボソームを作るためには、それらのT<sub>c</sub>前後又はわずかに高い温度、例えばT<sub>c</sub>よりも5℃まで高い温度で、このような脂質を加熱するのが好ましい。

好ましい実施態様においては、卵ホスファチジルコリンが用いられる。本発明の多数の実施態様においては、選ばれたリン脂質にかかわらず、リボソームにステロイド成分を加えてもよい。このようなステロイド成分は、例えば、コレステロール、コレスタノール、コプロスタノール又はコレスタンよりなる群から選ばれてもよい。更に、コレステロールヘミスクシネート (CHS) のようなステロールの有機酸誘導体とともに、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体 (PEG-コレステロール) を、上記リン脂質のどれかと組み合わせて用いてもよい。アルファ

コフェロールヘミスクシネート (THS) の有機酸誘導体を用いてもよい。CHS 及び THS 含有リボソーム並びにそれらのトリス形態は、一般に、ステロール類を含むリボソームを製造する当該技術において公知の任意の方法で作ることができる。

得られたリン脂質-ステロール混合物が、安定なリボソームになるのであれば、上記のどのステロールを用いてもよい。特に、Janoff 等、米国特許第 4, 721, 612 号、1988 年 1 月 26 日発行、名称“ステロイドのリボソーム”及び Janoff 等、PCT 公開番号 87/02219、1987 年 4 月 23 日発行、名称“アルファトコフェロールを基体とした媒体”の方法を参照のこと。これらの関連部分は、ここに参照のために記載されている。リボソームが、剤の急速な放出を防ぐように設計されているある例においては、リボソームを含む脂質の 30~45 重量モル%に等しい量のコレステロールを、上記リン脂質又はリン脂質/ステロイドの組合せの何れかと組み合わせて用いるのが好ましい。一般に、このような組成物は、蓄積された剤のリボソームからの好ましくない急速な放出をきつと防ぐであろう。リボソームからの剤の急速な放出を防ぐ膜安定化成分と脂質との任意の組合せを用いてもよく、当業者であれば、剤の急速な放出を防ぐリボソームを製剤化するために、膜安定化成分とリン脂質を改変することができるであろう。

本発明のこの態様においては、ホスファチジルコリンか、あるいは約 45 重量モル%のコレステロールと約 55 重量モル%のホスファチジルコリンの混合物のいずれかをを用いるのが最も好ましい。

本発明のリボソームを形成するには、いくつかの方法を用いる

エクストルーダーを用いることができる。このような装置は、LUV の押し出しをさせるリボソーム懸濁温度を高めるのに役立つ。熱ジャケットを備えたエクストルーダーで使用される脂質には、例えば DSPC、DPPC、DMPC および DAPC 又はこれらの混合物があり、これらは、リボソームからの剤の急速な放出を防ぐために、ある実施態様ではコレステロールを含んでもよい。一般に、DSPC を含むリボソームは 65℃で、DPPC を含むものは 45℃で、DAPC を含むものは 85℃で (脂質 Tc より 5℃高い) 押し出される。

示されたように、本発明で用いるのに好ましいリボソームは、大きさが約 0.06~0.3 ミクロンの LUV である。本出願において規定されているように、小胞の均一な母集団は、実質的に、同一サイズのリボソームを含むものであり、粒子サイズのガウス分布を有していてもよい。このような母集団は、均一サイズ分布であるといわれ、サイズに関して、単一モード (unimodal) であってもよい。“単一モード”という用語は、粒子サイズの狭い分散性を有する母集団を意味し、粒子は単一の“モード”である。リボソームの母集団は、弾性光散乱法により測定した場合に、その母集団がガウス分布に近似し、二次多項式がサンプルの自己相関関数の自然対数に合致すれば、単一モードである [Koppel, J. Chem. Phys., 57, 4814 (1972)]。この合致がぴったりしていればいるほど、単一モード性 (unimodality) の程度はよくなる。この合致の厳密性は、サンプルのカイの 2 乗 ( $\chi^2$ ) 値が、どれだけ 1 に近いかにより、求めることができる。2.0 以下の  $\chi^2$  値は、単一モードの母集団を示す。

本発明を実施するに際し、他の粉碎技術を用いてもよい。例え

ことができる。例えば、多重ラメラ小胞 (MLV)、安定複ラメラ小胞 (SPLV) 又は逆相蒸発小胞 (REV) を用いることができる。しかし、用いられるフィルターサイズによって決まる大きさの大単ラメラ小胞 (LUV) を形成するフィルターから、MLV を押し出すのが好ましい。一般に、30、50、60、100、200 又は 800 nm の細孔のポリカーボネートフィルターを用いることができる。Cullis 等、PCT 公開番号 WO 86/000238、1986 年 1 月 16 日 (その関連部分は、ここに参照のために記載されている) に記載されているこの方法では、リボソーム懸濁液を押し出し装置に繰返し通して、均一サイズ分布のリボソームの母集団とする。

例えば、直路 (straight-through) 膜フィルター (ヌクレオポア (Nucleopore) ポリカーボネートフィルター) 又は蛇行路フィルター (例えば、0.1  $\mu$ m サイズのヌクレオポアフィルターメンブラフィル (membrafil) フィルター (混合セルロースエステル)) により濾過を行ってもよく、あるいはホモゲナイゼーションのような別の粉碎技術により行ってもよい。リボソームの大きさは、直径が 0.03 から約 2 ミクロン以上まで変わってもよく、好ましくは 0.05~0.3 ミクロン、最も好ましくは 0.1~0.2 ミクロンである。この大きさの範囲は、MLV、SPLV 又は LUV であるリボソームを含むものである。

本発明において、好ましいリボソームは、0.1~0.2 ミクロンの単ラメラリボソームであるものである。

上に述べたように、室温よりも高い、ゲルから液晶までの Tc を有するリボソームを形成するのに、多数の脂質を用いることができる。このような場合、加熱バレル又は熱ジャケットを有する

ば、ホモゲナイゼーションやミリング技術をうまく用いることができる。このような技術により、サイズ分布に関して均一又は単一モードであるリボソームが得られる。上に述べた特性を有する第一の緩衝水溶液をカプセル化するリボソームを調製してもよい。

リボソーム調製中、脂質を懸濁させるために、有機溶媒を用いてもよい。本発明での使用に適した有機溶剤には、脂質を可溶化する、各種の極性及び誘電性能を有するものがあり、とりわけ、例えば、クロロホルム、メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、塩化メチレン及びベンゼン:メタノール (70:30) のような溶剤混合物が挙げられる。その結果、脂質を含む溶液 (脂質と他の成分とが全体に均一に分散されている混合物) が形成される。溶剤は、一般に、それらの生物適合性、低毒性及び可溶性に基づいて選択される。

本発明の一つの好ましい実施態様は、臨床部位 (clinical site) において、剤の高度に有効な取り込みが行われる 3 成分リボソーム-薬理系である。剤が、リボソームの内部が酸である膜 pH 勾配で薬理系であるものである場合、システムの第一の成分 (バイアル 1) は、酸性水溶液又は緩衝液、例えば、クエン酸緩衝液 (300 mM、pH 3.8~4.2、好ましくは 4.0) 内のリボソームを含む。

システムの第二の成分 (バイアル 2) は、相対的に塩基性の緩衝液又は水溶液、例えば、炭酸ナトリウム若しくはビスホスファトリウム溶液又は pH 10~12、好ましくは pH 11.5 の塩化ナトリウム/HEPES 緩衝生理食塩水 (“HBS”) を含み、これはリボソーム製剤の外部水溶液又は緩衝液の一部となる。

第三の成分 (バイアル 3) は、取り込もうとする剤である。上

記処理システムは、上に述べたように、酸性媒体内のリボソームを含む第一バイアル、相対的に塩基性の溶液を含む第二のバイアル及びアミノ酸又はペプチド(剤)医薬を含む第三のバイアルの3バイアル系として、提供されることができる。リボソームの内部緩衝液が相対的に塩基性の、即ちpHが8.5~11.5である緩勾配で装填される剤に、同様の処理系を提供することができる。このような場合、第一の成分は、相対的にアルカリ性の緩衝液内のリボソームを含み、第二の成分は、相対的に酸性の溶液を含み、第三の成分は、取り込もうとする剤を含むことができる。

リボソームをはさむpH勾配の形成(第一バイアルと第二バイアルを混合することにより)後、アミノ酸又はペプチドと混合する前に、リボソームを加熱してもよい。ある環境下、及び剤の急速な放出をできるだけ少なくするために、少なくとも30モル%のコレステロールを含むリボソーム中に剤を装填しようとする場合は、リボソーム組成物にとって及びアミノ酸又はペプチドの存在にとって適当なある温度まで、リボソームを加熱して、装填を促進することが有利であろう。装填は、例えば、4~60℃の温度で生ずることができる。

上記処理系を用いて、剤をリボソーム内に装填するためには、Mayer等、PCT公開番号WO88/06442、1988年9月7日(その関連部分は、ここに参照のために記載されている)に記載されている方法を、本発明の剤に使うために改変してもよい。

リボソーム-剤搬送系においては、剤をリボソーム内に取り込むか又はリボソームと会合させ、その後、治療しようとする患者に投与する。剤が薬剤である例については、Rehaan等、米国特

タンスルホン酸("CHES")、ピペラジン-N, N'-ビス[2-エタンスルホン酸]("PIPES")及びそれらの混合物を挙げることができる。本発明において、好ましい外部緩衝液は、NaCl/HEPESであり、更に好ましくは、pH7.5の150mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mM HEPESである。

本発明を利用する剤の装填効率は、一般に、20%から100%までの範囲であり、好ましくは50%以上である。一般に、本発明による剤の装填効率は、ヘンダーソン-ハッセルバッハの関係から期待される通りである。もちろん、全ての剤が、ヘンダーソン-ハッセルバッハの関係に従ってリボソーム内に容易に蓄積するのではなく、ある剤(比較例13、14、15参照)は、ある場合には、全く蓄積しないようである。

本発明の方法により形成されるリボソームを、形成の種々の段階で、凍結乾燥又は脱水してもよい。例えば、溶剤の除去後、剤の添加前、あるいは膜の水和によるリボソームの形成前に、脂質膜を凍結乾燥してもよい。このような脱水は、脂質又はリボソームを減圧下におくことにより実施することができ、それにより全ての懸濁している溶剤を除去する。

リボソーム自体は、多くの任意の方法で脱水することができる。Bally等、PCT公開番号86/01102、1986年2月27日公開、名称"リボソーム内への抗癌剤のカプセル化"; Janoff等、PCT公開番号86/01103、1986年2月27日公開、名称"脱水リボソーム"; Schneider等、米国特許第4229360号、1980年10月29日発行; 及びMayer等、PCT公開番号88/06442、1988年9月7日公開(これらの関連部分は、ここに参照のために記載されている)の

特許3,993,754号; Sears、米国特許第4,145,410号; Papadopoulos等、米国特許第4,235,871号; Schneider等、米国特許第4,114,179号; Renke等、米国特許第4,522,803号; 及びFountain等、米国特許第4,588,578号参照。明細書全体を通じて用いられる場合、アミノ酸及びペプチドという用語と剤という用語は、互いに交換できるものとして用いられる。

内部緩衝液として使用する緩衝液の選択は、装填するために選ばれる剤によって変わるであろう。当業者であれば、特定の剤のイオン化された種の相対溶解度及び内部緩衝液として使用する緩衝液を決めるための緩衝強度を評価することができるであろう。本発明においては、必要な場合、溶液が医薬的に適合していれば、即ち、そこでその溶液を有害作用なしに患者に投与できれば、上に一般的に述べた特性を有する任意の緩衝液を用いることができる。

代表的な内部緩衝液としては、とりわけ、クエン酸、シュウ酸、コハク酸及びその他の好ましい有機酸塩が挙げられる。100mMから300mMまでの範囲の濃度のクエン酸が好ましい。クエン酸緩衝液の濃度は、300mMであることが最も好ましい。

代表的な外部緩衝液としては、とりわけ、NaCl、KCl、リン酸カリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、ビスリン酸ナトリウム、硫酸カリウム、(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)("HEPES")、2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸("MES")、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-3-プロパンスルホン酸("EPPS")、2-[N-シクロヘキシルアミノ]エ

方法により、親水性の剤の存在下で、リボソームを脱水してもよい。他方或いはそれに加えて、水和リボソーム製剤を液体窒素内の周囲媒体に入れ、脱水工程前にそれを凍結させることにより、水和リボソーム製剤を脱水してもよい。

前もっての凍結を伴う脱水は、Bally等、PCT公開番号86/01103、1986年2月27日公開(その関連部分は、ここに参照のために記載されている)の技術による製法において、嚢膜のような一つ以上の保護剤の存在下で行うことができる。このような技術は、製剤の長期保存及び安定性を高める。例えば、0.5:1から100:1の範囲、好ましくは20:1の嚢:脂質量比/重量比で、装填された剤を再水和中に保持するリボソームの能力に影響を与えることなく、剤を緩衝液と混合することができる。上記リボソーム製剤の脱水には、他の適当な方法を用いてもよい。

リボソームを脱水したら、それらを使用するまで、長期間保存することができる。保存に適した温度は、リボソームの脂質組成及びカプセル化された物質の温度感受性によって決まるであろう。例えば、アミノ酸及びペプチドは、熱に不安定であり、従って、このような剤を含む脱水リボソームは、剤の効能が失われないように、冷蔵条件下、例えば約4℃で保存しなければならない。また、このような剤については、脱水工程を、室温よりもむしろ低温で行うのが好ましい。脱水リボソームを使用する場合は、水溶液、例えば蒸留水又は適当な緩衝液を単にリボソームに加え、再水和させることにより、再水和を行う。溶液を穏やかに渦巻かせて、リボソームを水溶液中に再懸濁させることができる。再水和は、室温又はリボソーム及びそれらの内部含有物の組成に適した

他の温度で行うことができる。

膜内外 pH 勾配を発生させるのに用いられる濃度勾配は、脱水の前かあるいは再水和の後に、上述の外部媒体交換技術を用いて、生成することができる。例えば、リボソームを、膜内外 pH 勾配の設定前に脱水してもよく、例えば、それらの第一の外部媒体から脱水してもよい。再水和の際、リボソームを相対的に酸性又は塩基性 pH の第二の外部媒体と混合することにより、pH 勾配を設定することができる。pH 勾配の設定と同時に又はその後に、剤をリボソームと混合することができる。膜内外 pH 勾配を持った後、リボソームを脱水する場合、それらを中性 pH の水溶液と混合して、リボソームを再水和してもよい。例えば、第一の媒体としてクエン酸緩衝液を含むリボソームを用いる上記の場合、再水和工程は、NaCl/HEPES 緩衝液と剤、例えばリジンメチルエステルを添加することにより進行するであろう。

リボソームが、相対的に塩基性の溶液（例えば、NaCl/HEPES）をすでに含み、従って、すでに膜内外 pH 勾配を有している場合は、水又は他の中性水溶液及び剤を加えて、再水和する。最後に、膜内外 pH 勾配を有し、剤を含有するリボソームを脱水した場合は、水又は他の水溶液を用いて、再水和が進行する。一方、必要であれば、第二の剤を添加してもよい。

反復投与及び徐放性製剤を必要とする多数の病状又は薬理学的状態の治療において、本発明のアミノ酸及びペプチド製剤を含むリボソームを、哺乳動物、特にヒトの治療に用いることができる。本発明の剤含有リボソームの投与形態によって、その化合物が搬送される器官の部位及び細胞が決まるであろう。

本発明のリボソームは、単独で投与されてもよいが、一般には、

きる。

また、患者の病状の性質及び重症さ又は薬理学的状態も、投与量（dosage regimen）に影響を与えるであろう。リボソーム形態での薬剤投与量は、一般に、遊離薬剤で用いられる量程度であると予測されるが、ある場合には、これらの限度範囲外の投与量を投与する必要があるかもしれない。

次の実施例は、説明の目的でのみ与えられるものであり、この発明の範囲を限定するものと考えるべきではない。

#### 実施例

##### 原料及び方法

卵ホスファチジルコリン（EPC）を Avanti Polar Lipids, Inc., Birmingham, Alabama から入手した。N-メチルアミン及び3H-トリフェニルホスホニウムブロミドを New England Nuclear から購入した。使用した他の全ての化学薬品は、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. から購入した。

リジンメチルエステルは、Sigma Chemical Co. から購入した。疎水性ペンタペプチド（H<sub>2</sub>N<sup>+</sup>-Ala-Met-Leu-Trp-Ala-COO<sup>-</sup>；ここで、カルボキシル官能基は、メチルエステル又はアミドとなるように変性した。）は、de Kroon 等、BBA, 981, 371 (1989) の固相合成法を用いて合成した。

##### 実施例 1

リボソームの膜内外 pH 勾配によるリジンメチルエステルの蓄積 - EPC 小胞

1.0 ml クエン酸（300 mM）緩衝液中、pH 4.0 で 50 mg の EPC を水和することにより、多重ラメラ小胞（MLV）

目的とする投与経路及び標準製薬プラクティスに関して選択される製薬組体と混合して、投与されるであろう。製剤は、非経口で、例えば静脈内に注射してもよい。非経口投与については、それらを、例えば、等張性が必要又は所望であれば、溶液を等張性にするのに十分な塩又はグルコースのような他の溶質を含んでもよい無菌水溶液の形で使用することができる。本発明のリボソームは、皮下又は筋肉内に用いてもよい。その他の使用法は、製剤の特性に応じて、当業者が想像できるものであろう。

経口投与形態については、本発明のリボソーム製剤は、錠剤、カプセル、ロゼンジ、トローチ、粉末薬、シロップ、エリキシル剤、水溶液、懸濁液等の形で使用することができる。錠剤の場合、使用できる組体としては、ラクトース、クエン酸ナトリウム及びリン酸の塩を挙げることができる。デンプン、潤滑剤、タルクのような種々の崩壊剤が、一般に錠剤に用いられる。カプセル形態での経口投与については、有用な希釈剤は、ラクトース及び高分子量ポリエチレングリコールである。経口用に水性懸濁液が必要な場合は、活性成分を乳化、懸濁剤と組み合わせる。もし所望であれば、ある種の甘味及び/又は着香剤を加えることができる。

局所投与形態については、本発明のリボソーム製剤を、ゲル、オイル、エマルジョン等のような投与形態に混入してもよい。これらの製剤は、クリーム、ペースト、軟膏、ゲル、ローションなどの直接塗布により投与することができる。病状又は薬理学的状態の治療でのヒトへの投与については、処方する医師が、特定のヒト治療対象者への新生物性剤の適当な投与量を最終的に決めるであろう。そして、これは、使用する剤の薬物動力学と共に、個人の年齢、体重及び反応によって変わるものと予測することがで

を製造した。MLV を液体窒素中で凍結し、50～60℃において、水中で融解し、5回の凍結融解を行なった。

得られた MLV を、Hope 等、BBA, 812, 55 (1985) に記載されているように、Lipex Biomembranes Inc. (Vancouver, Canada) から取得した装置を用い、2枚重ねの100 nm 細孔のポリカーボネートフィルター（Nucleopore）から10回吐出した。得られた大単ラメラ小胞（LUV）は、Nicom P 粒子サイザーを用いる弾性光散乱（QELS）で測定した直径が108 nm であった。

pH 4.0 の媒体中の LUV を、150 mM NaCl、2.0 mM HEPES（pH 7.5）（Hepe s 緩衝生理食塩水、“HBS”）で崩もって平衡化した100 cm の Sephadex G-50（中位）カラムに通し、外部/内部の pH が 7.5/4.0 の pH 勾配を発生させた。

まず、pH 勾配を示す LUV 0.25 ml を添加した1.0 ml HBS 媒体に、0.47 mg のリジンメチルエステル（2.0 mM リジンメチルエステル）を溶解することにより、リジンメチルエステルの取り込みを開始した。23℃でリボソームをインキュベートし、このインキュベーション混合物から、選ばれた時間（図1参照）にその一部の0.1 ml を取り出し、1 ml（乾燥）Sephadex G-50 カラムに通すことにより、取り込まれなかった物質を除去し、2500 rpm で1分間遠心分離した。

##### 実施例 2

pH 勾配無しの場合

pH 4.0 の媒体中の LUV を、pH 4.0 において、300



mMクエン酸緩衝液で前もって平衡化した10cmのSephadex G-50 (中位) カラムに通して、実施例1の方法を繰り返し、pH勾配を発生させなかった。

pH 7.0の媒体中でLUVを作り、150mM NaCl、20mM HEPES (pH 7.5) (Hepe s緩衝生理食塩水、"HBS") で前もって平衡化した10cmのSephadex G-50 (中位) カラムに通して、同様にこの方法を繰り返し、pH勾配を発生させなかった。

### 実施例3

EPC LUVに装填されたリジンメチルエステルの測定

リジンメチルエステルの標識第一級アミノ基に対してTNBS (トリニトロベンゼンスルホン酸) を使い、Hope 及び Cullis, J. Biol. Chem., 262, 4360 (1987) が用いた方法を改変することにより、実施例1、2のLUVの内側のリジンメチルエステル濃度を測定した。標識に用いた緩衝液は、pH 10.0の100mM NaHCO<sub>3</sub>、50mM H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>であった。2.5mlの緩衝液 (pH 10.0) を含む対照吸収セルを、比較光束内に置いた。サンプル吸収セルは、2.5mlの緩衝液 (pH 10.0) を0.5mM TNBSと共に含み、次いで、リジンメチルエステルを含む小胞の一部 (50ul) を添加した。得られた吸光度変化を、暗所で1時間インキュベートした後、420nmで測定した。両吸収セルにトリトン (Triton) X-100 (200ul, 0.5%) を加えて、小胞を可溶化し、TNBSに対して存在する全ての第一級アミノ基を露光した。活性剤存在下の吸光度を、100%標識を示すものとした。

に急速に装填された。測定されたpH勾配の対応する低下も認められ、黒丸で示され、右軸の目盛りを用いて読みとられた。ここで、勾配は、3.5から1pH単位まで低下した。残留pH勾配のこのような低下は、中性の膜を透過した後のこのメチルエステルのプロトン化によるものである。取り込まれた最高濃度は、リン脂質1umol当りリジンメチルエステル約85nmolであった。この取り込みの高濃度は、リジンメチルエステルが漏出することなく、少なくとも24時間保持された。

リボソームがpH勾配を示さず (上記実施例2参照)、内部及び外部浴液が共にpH 4.0 (4.0/4.0) (白四角) である場合、又は両者がpH 7.5 (7.5/7.5) (白三角) である場合は、リジンメチルエステルは、ほとんどLUV内に取り込まれなかった (pH勾配を有する小胞について認められたもののわずか10%程度)。

### 実施例7

リボソーム膜内外pH勾配によるリジンメチルエステルの装填—EPC: コレステロール小胞

EPC 43mgとコレステロール17mgとを1.0mlのクロロホルムに溶解して、EPC: コレステロール (55: 45mol%) を作成した。次いで、窒素気流下でクロロホルムを除去した後、引き続いて減圧下に貯蔵した。20mlのクエン酸緩衝液 (pH 4.0) を用いて、実施例1の方法を使用し、凍結解凍したMLVを作り、次いで同様に押し出して、LUVを形成した。EPC: コレステロール小胞の場合、押出工程は、65℃で生じた。

### 実施例4

pH勾配と膜ポテンシャルの測定

Hope 等、BBA, 812, 55 (1985) 及び Madden 等、Chem. Phys. Lipids, 53, 37 (1980) に示されているように、<sup>14</sup>C-メチレンアミン及び<sup>3</sup>H-トリフェニルホスホニウムプロミド (<sup>3</sup>H-TTPP) をそれぞれ用い、pH勾配と存在する膜ポテンシャルの大きさを測定した。用いた濃度は、1uCi/mlであった。蓄積したプローブの量は、液体シンチレーション計数により測定した。膜内外pH勾配は、Mayer 等、Biochemistry, 27, 2053 (1988) に示されているように、pH = log ([メチルアミン] in / [メチルアミン] out) の関係を用いて計算することができた。膜ポテンシャルは、<sup>3</sup>H-TTPPについて同様に計算した (Hope 等、BBA, 812, 55 (1985) 参照)。

### 実施例5

リン脂質濃度の測定

リン脂質濃度は、Fisk 及び Subbarow, J. Biol. Chem., 66, 375 (1925) の方法を改変して計算した。代表的なリン脂質濃度は、約3.0mMであった。

### 実施例6

EPC LUV内へのリジンメチルエステルの装填結果

図1は、白丸で示されるように、内部が酸性 (ここでpHi = 4.0, pHo = 7.5) の実施例1の方法により、リジンメチルエステルが、EPC LUV内に急速に蓄積することを示す。アミノ酸は、インキュベーションの最初の5~10分で、最高濃度

実施例1に開示されているようにして、20℃において、pH勾配が設定され、リジンメチルエステルが小胞内に装填された。

リジンメチルエステルの装填工程を4℃及び37℃で行なった状態で、上記方法を繰り返した。実施例3、4及び5に従って、EPC: コレステロール小胞内へのリジンメチルエステルの装填量を測定した。

図2は、7.5/4.0 (外部/内部) のpH勾配を示すLUV内へのアミノ酸装填の時間経過のグラフである。取り込みの時間経過は、37℃ (白四角)、20℃ (白三角) 及び4℃ (白丸) の取り込みインキュベーション温度において報告されている。非常に高い濃度 (リン脂質1umol当り約70nmol) の装填が、37℃では10分以内、20℃では1時間、4℃ではおそらく22時間以上後で達成された。取り込まれたリジンメチルエステルの量は、高温 (37℃) での長期間 (20時間を越える) 後でさえ、まったく安定なままであることが再度わかった。

### 実施例8

実施例1の方法を用い、23℃で1時間のインキュベーションを行なって、アミノ酸リジンエチルエステルをLUV内へ装填した。このアミノ酸誘導体の装填は、リン脂質1umol当りバプチド378.0nmolの値で起こった。

### 実施例9

実施例1の方法を用い、23℃で1時間のインキュベーションを行なって、ボンベシン (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) をLUV内へ装填した。このペ

ブチド酸誘導体の装填は、リン脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド34.6  $\text{nmol}$  の値で起こった。

#### 実施例10

実施例1の方法を用い、ガストリン関連ペプチド ( $\text{N-tert-BOC-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$ ) を、LUVと共に、23℃で1時間インキュベートした。このインキュベーション期間の後、リン脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド25.1  $\text{nmol}$  が、LUV内に装填された。

#### 実施例11

実施例1の方法を用い、ペプチドである成長ホルモン放出因子断片 ( $\text{Lys-Tyr-Trp-Trp-Phe-NH}_2$ ) 74  $\mu\text{g}$  を、LUVと共に、60℃で2時間インキュベートした。このインキュベーション期間の後、リン脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド195.0  $\text{nmol}$  が、LUV内に装填された。

#### 実施例12

実施例1の方法を用い、ペプチドである成長ホルモン放出因子断片 ( $\text{Lys-Tyr-Trp-Trp-Phe-NH}_2$ ) 74  $\mu\text{g}$  を、LUVと共に、23℃で2時間インキュベートし、その結果を図3に示す。2時間のインキュベーション期間の後、リン脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド約55  $\text{nmol}$  が、LUV内に装填された。図において、白四角は、7.5/4.0 (外部/内部) の初期pH勾配での取り込み過程を示し、黒四角は、残留pH勾配を示すが、それは右軸の目盛りを用いて読みとられた。白丸は、pH勾配がない場合の取り込み経過を示し、内部及び外部溶液が、

両者とも最初pH7.5であった。

#### 比較例13

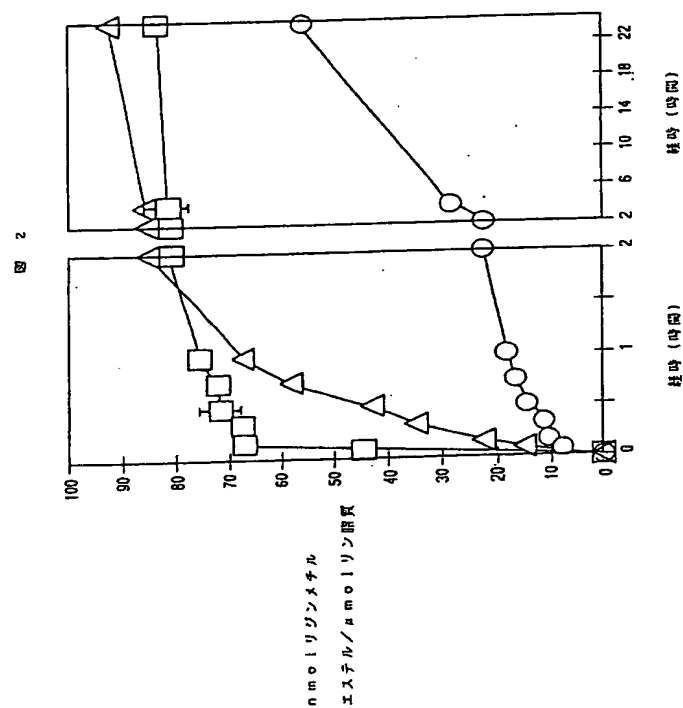
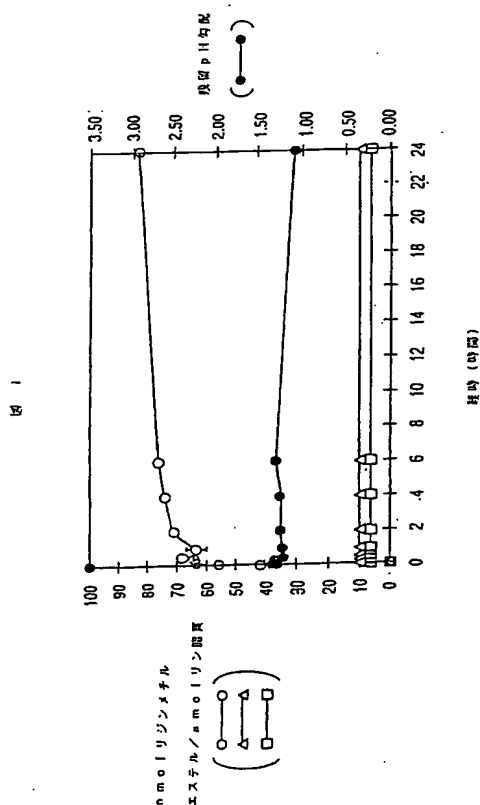
実施例1の方法を用い、アミノ酸誘導体であるヒスチジンメチルエステル (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) 0.48  $\text{mg}$  を、23℃でLUVとインキュベートした。1時間のインキュベーション後、装填は起こらなかった (脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド0  $\text{nmol}$  が装填)。

#### 比較例14

実施例1の方法を用い、ペプチドである ( $\text{Lys}$ )、メチルエステル0.34  $\text{mg}$  を、23℃でLUVとインキュベートした。約1時間のインキュベーション後、装填は起こらなかった (脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド0  $\text{nmol}$  が装填)。

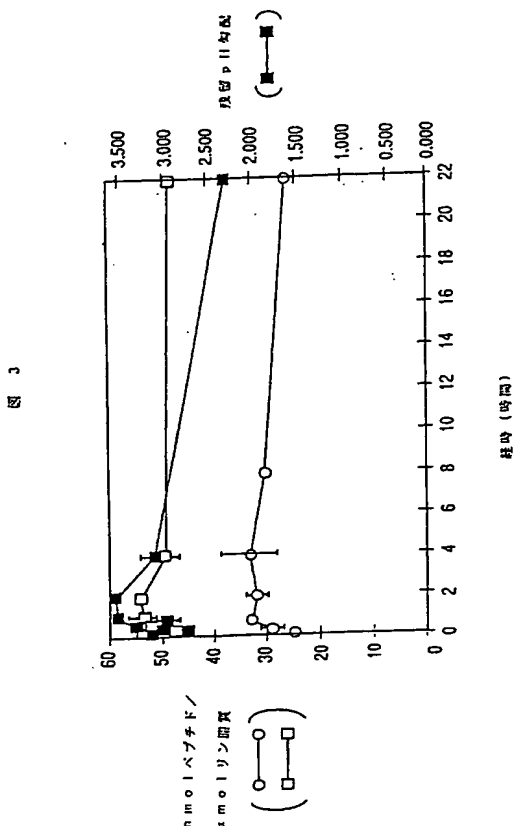
#### 比較例15

実施例1の方法を用い、ペプチドである ( $\text{Lys-Ala}$ )、メチルエステル0.95  $\text{mg}$  を、23℃でLUVとインキュベートした。約1時間のインキュベーション後、装填は起こらなかった (脂質1  $\mu\text{mol}$  当りペプチド0  $\text{nmol}$  が装填)。



國際調查報告

International Application No. PCT/US91/05281



CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF REPORT: Classify page symbols, tables, materials and TPC (51); A51R 37/22		
U.S. CL. 424/450		
N FIELD SEARCHED		
Minimum Documentation Search?		
Classification System	Classification Symbols	
U.S.	264/4.1; 424/450; 436/829	
Documentation searched under minimum documentation to see if subject matter contained in the field searched?		
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Excerpt of Document, or summary statement, or the relevant passages	Relevant to Claim No. 10
Y	US. A. 4,885,172 (BALLY) 05 DECEMBER 1989 See the Abstract; summary; column 6, line 1 and column 7, line 53.	3-10
Y	Biochemicals and Physics Acta. Volume 857, 1986 (MAYER), pages 123-126. See the Abstract; page 124, column 2 and the last paragraph on page 125.	1-10
Y	Biochemistry, Volume 27, 1988 (MAYER), pages 2053-2060. See the Abstract; page 2053, column 1; page 2058, column 2 and page 2060, column 1.	1-10
A	Chemistry and Physics of Lipids, Volume 53, 1990 (MADDEN), pages 37-46, entitled, "The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey".	1-10
<p>* Special categories of cited documents -</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- "A" document defining the current state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li>- "X" patent document but published on or after the international filing date</li> <li>- "P" document which may contain claims or drawings (omitted by category) or other material not disclosed</li> <li>- "D" document referred to in an earlier document, see definition in other category</li> <li>- "C" document published prior to the international filing date but after than the priority date (except)</li> </ul> <p>* Other document categories that the international filing date was used and are included with the abstract that are to understand the principle to others understanding the art</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- "E" document for technical reference that formed common knowledge in conventional prior art at the time of invention</li> <li>- "F" type of technical references, the claimed maximum amount of information is covered at maximum 50% over the amount of information available in the prior art</li> <li>- "G" document describing the later patent family</li> </ul>		
IV. CERTIFICATE		
Date of the Affirmation of the International Search Report	Date of Issuance of the International Search Report	
01 OCTOBER 1991	07 NOV 1991	
International Searching Authority	Signature of Authorized Official	
	G. Kishore	
ISA/US	for GK	

フロントページの続き

(72) 発明者 クラーク・レウイス, イアン  
カナダ国 プリティッシュコロンビア州  
ヴィ 6 アール 2 ビー 9 ヴァンクーバー  
ウエストウエルフスアベニュー 4377

(72) 発明者 クリス、ピーター、アール  
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州  
ヴィ6アール 1エイチ4 ヴァンクーバ  
ー ウェストファーストアベニュー 3732